

⑫ 公開特許公報(A)

平2-79994

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月20日

C 12 P 21/08

6712-4B

8717-4B

8515-4B

C 12 N 15/00

5/00

C

B※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全11頁)

⑮ 発明の名称 モノクローナル抗体の作製方法

⑯ 特 願 昭63-234260

⑰ 出 願 昭63(1988)9月19日

特許法第30条第1項適用 昭和63年8月20日、日本癌学会発行の「第47回日本癌学会総会記事」に発表

⑱ 発 明 者 木 幡 陽 東京都多摩市落合6-6-4-203
⑱ 発 明 者 小 川 智 也 東京都武蔵野市吉祥寺北町3-6-6-3-101
⑱ 発 明 者 北 島 徹 東京都豊島区長崎5-1-31-503
⑱ 発 明 者 大 林 弘 一 東京都杉並区下高井戸5-19-3
⑲ 出 願 人 株式会社ニチレイ 東京都千代田区三崎町3丁目3番33号
⑲ 出 願 人 東和化成工業株式会社 東京都千代田区大手町2丁目1番2号
⑳ 代 理 人 弁理士 谷川 英次郎
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

モノクローナル抗体の作製方法

2. 特許請求の範囲

(1) 抗原となる糖鎖を、免疫原性を有するよう第1のキャリアに結合したものを免疫原として用いて免疫した動物からの抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを作製する工程と、上記糖鎖を上記第1のキャリアとは異なる第2のキャリアに結合したものととの反応性をスクリーニングすることにより、上記ハイブリドーマのうち上記糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体を産生しているものを選択する工程と、選択されたハイブリドーマからモノクローナル抗体を回収する工程とを含む、糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体の作製方法。

(2) 前記第1のキャリアはタンパク質である請求項1記載の方法。

(3) 前記タンパク質はメチル化ウシ血清アルブミンである請求項2記載の方法。

(4) 前記第2のキャリアはポリリジンである請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

(5) 前記第2のキャリアであるポリリジンをN-アセチル化でブロッキングしてポリリジンの非特異的反応を防止する請求4記載の方法。

(5) 前記糖鎖は、スパーサーを介して前記第1のキャリアに結合されている請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

(6) 前記糖鎖は癌性変化を受けた糖タンパク質の糖鎖である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

(7) 前記糖鎖は合成されたものである請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、癌マーカー糖鎖のような、糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体の作製方法に関する。この発明の方法により作製されたモノクローナル抗体は癌等の診断薬としての用途を有する。

【従来の技術】

細胞の癌化に伴って細胞表面の糖鎖抗原は糖鎖不全現象や異常糖鎖への新規合成等による様々な異常をきたすことが1970年第の初めから知られていた(木幡陽、「癌化と療法」13巻、3号、747頁、1986; 神奈木玲児ら、「化学と生物」、26巻、4号、220頁、1988)。また、癌患者の血清等の体液中の癌細胞由来の糖鎖抗原(糖タンパク質や糖脂質糖鎖)も癌性変化を受けている場合が多く、従来からこれら抗原に対する抗体による免疫学的癌診断法が開発されている。特に、近年モノクローナル抗体の作製により、CA19-9、CA12-5、CSLEX-1等が腫瘍診断の良いマーカーと成り得ることが示されている(木幡陽、「Oncologia」14巻、秋、77頁(1985))。

これら臨床領域で注目を集めているモノクローナル抗体は全て癌細胞そのものを免疫原にして得られた無数のハイブリドーマの産生する抗体の中から偶然的に選出されたものである(木幡陽、前出)。

体の効率的な製造技術の開発が要望されていた。

【発明が解決しようとする問題点】

従って、この発明の目的は、癌マーカー糖鎖のような、糖鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を効率良く作製することができる新規な方法を提供することである。

【問題点を解決するための手段】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗原となる糖鎖をタンパク質のようなキャリアに結合したものを免疫原として免疫した動物からの抗体産生細胞を用いてハイブリドーマを作製し、一方、所望の抗原を産生しているハイブリドーマを選択する際には上記糖鎖を上記キャリアとは異なるキャリアに結合したものととの反応性をスクリーニングすることにより、糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを効率良く作製することができることを見出しこの発明を完成した。

すなわち、この発明は、抗原となる糖鎖を、

さらに、診断に用い得る特異性の高いモノクローナル抗体を作製するため、癌組織から糖タンパク質を精製し、これを免疫原に用いることが試みられている(「総合臨床」34巻、12号、2625、1985)。しかし、この場合、糖鎖の癌性変化部分に対するモノクローナル抗体を効率よく得ることができないことが知られている。これは糖鎖を担っているタンパク質部分の方が免疫原性が高いため、糖鎖部分に対する抗体ができにくいと考えられている。

この問題を解決するために、特開昭63-17900号には、糖鎖のキャリアタンパク質として免疫する哺乳動物の自己タンパク質を用いることを特徴とする糖鎖抗体の製造法が開示されている。特開昭63-17900号では、 γ -GTPの糖鎖に対するモノクローナル抗体を作製しているが、この方法では特定の癌性変化糖鎖そのものに対する抗体を作製することができず、抗体の認識する糖鎖の分子構造の決定も容易ではない。従って、特定の癌性変化糖鎖構造を特異的に認識するモノクローナル抗

免疫原性を有する第1のキャリアに結合したものを免疫原として用いて免疫した動物からの抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを作製する工程と、上記糖鎖を上記第1のキャリアとは異なる第2のキャリアに結合したものととの反応性をスクリーニングすることにより、上記ハイブリドーマのうち上記糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体を産生しているものを選択する工程と、選択されたハイブリドーマからモノクローナル抗体を回収する工程とを含む、糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体の作製方法を提供する。

【発明の効果】

この発明の方法によると、例えば癌マーカー糖鎖のような糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体を効率良く作製することができる。これは、ハイブリドーマの選択に、免疫原に用いたキャリアとは異なるキャリアに糖鎖を担持したものととの反応性をスクリーニングするため、免疫原のキャリアを抗原としたものは反応せず、免疫原の

糖鎖を抗原としたものだけが反応して選択されることに基づく。癌によっては糖鎖が癌性変化することが知られているので、このような癌性変化した糖鎖を抗原として、モノクローナル抗体を作製すると、そのモノクローナル抗体はその癌の診断薬として用いることができる。従って、この発明により、このような癌診断薬としての用途を有するモノクローナル抗体を効率良く作製することが可能になった。

[発明の具体的説明]

この発明の方法において、免疫原として用いられるものは、抗原となる糖鎖を、免疫原性を有する第1のキャリアに結合したものである。ここで、抗原となる糖鎖としては、特に限定されるものではないが、癌により癌性変化を受けた糖タンパク質の糖鎖を挙げることができる。後述の実施例ではヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)の癌性変化糖鎖を用いている。上述のように、癌性変化糖鎖のいくつかは既にその構造が知られており、また、糖鎖を有機化学的に合成する方法も知られ

キャリアに直接結合することもできるし、スパーサーを介して結合することもできる。スパーサーとしては、炭素数が8ないし40程度の炭素鎖を含むものが好ましい。抗原となる糖鎖が、免疫原性を有するキャリアから空間的な距離をあけてキャリアに結合されている方が糖鎖を抗原とする抗体が産生され易いと考えられ、また、一般に、有機化学的に糖鎖を合成する場合にはこのようなスパーサーが付いたものの方が合成し易いので、糖鎖はスパーサーを介してキャリアに結合することがより好ましい。スパーサーを介して糖鎖をタンパク質等に結合することは、いわゆるカルボジイミド法〔文献：日本生化学会編「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法」、82～83頁、東京化学同人〕により行なうことができる。

次いで、上記免疫原で動物を免疫し、抗体産生細胞を回収する。これは、従来から、種々の抗体を産生するために行なわれている周知の操作により行なうことができる。

次いで、回収された抗体産生細胞と、ミエ

ている(例えば、小川らの方法(Sadozai K.K. et al., "Agric. Biol. Chem." 50, 251, 1986; 特開昭63-39890号)ので、この発明の方法においては、癌性変化糖を有機化学的に合成したものを好ましく用いることができる。もっとも、天然の糖タンパク質等から分離した糖鎖も用いることができることは言うまでもない。

一般に、糖鎖には免疫原性がないか又は弱いので、糖鎖に対する抗体を作製するためには糖鎖を免疫原性を有するキャリアに結合して免疫原として用いる必要がある。免疫原におけるキャリアとしては、免疫原性を有する、タンパク質のような物質であればいずれの物質であってもよく、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)メチル化ウシ血清アルブミン、キーホールリンベットヘモシアニン、(KLH)、血清アルブミン、血清グロブリン等を挙げることができる。これらのうち、最も好ましいものはメチル化ウシ血清アルブミンである。

抗原となる糖鎖は、免疫原性を有する第1の

ローマ細胞とを融合してハイブリドーマを作製する。これも、従来と同様、周知のケーラーとミルシュテインの方法により行なうことができる。

HAT培地等を用いた常法により、ハイブリドーマを回収した後、ハイブリドーマのうち糖鎖を抗原とする所望のモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを選択する。この際、免疫原中に用いた抗原となる糖鎖を、免疫原に用いた第1のキャリアとは異なる、第2のキャリアに結合したものの反応性をスクリーニングし、反応したハイブリドーマを選択する。第2のキャリアとしては、糖鎖を結合することができるものであって第1のキャリアとは異なるものであればいずれのものでもよく、それ自体で免疫原性を有しているものであっても有していないものであってもよい。第2のキャリアの例としては、第1のキャリアと同様なタンパク質やポリリジンやポリDリジンのような合成ペプチドを挙げることができる。第2のキャリアとして特に好ましいものとしてポリリジンを挙げることができる。第2の

キャリアへの糖鎖の結合も、第1のキャリアへの糖鎖の結合と同様な方法により、又は、キャリアの種類に応じて種々の公知の方法により行なうことができる。

第2のキャリアに糖鎖抗原を結合したものの反応性のスクリーニングは、例えば、これをマイクロプレートのウェルにコートし、ハイブリドーマの培養上清をウェルに加えて、その反応の有無を周知のELISAの手法により、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼを用いて酵素免疫学的に検出することにより行なうことができる。この際、糖鎖-第2キャリア結合物をN-アセチル化処理することによりバックグラウンドを抑え、高感度を得ることができる。N-アセチル化は、例えば、無水酢酸で処理することにより行なうことができる。

次いで、このようにして選択された、糖鎖に特異的に反応する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養し、これから所望のモノクローナル抗体を回収する。ハイブリドーマ

還元標識後、ろ紙電気泳動で分割すると中性少糖はほとんど検出されず、モノシアルリ体とジシアルリ体の2群の酸性少糖が検出された。これらの酸性少糖には、図1のAに示したような5種類の糖鎖が含まれていた。次に4例の絨毛癌患者尿から精製されたhCGについて同様に調べたところ、図1のBに示すように、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4Man残基が付いた複合型糖鎖構造が多数出現している。このことは、絨毛癌では絨毛細胞にないGlcNAc β 1 \rightarrow 4Man残基を作り出すN-アセチルグルコサミン転移酵素IVが発現しているものと考えられる。

そこで、本発明者らは、この絨毛癌特異的糖鎖構造、すなわち、異常二本鎖構造を認識するモノクローナル抗体を作製することにした。

hCGの糖鎖の癌性変化部分の7糖は上記小川らの方法により有機化学的に合成した。この合成7糖には8個の炭素から成るスパーサーが結合されており、その構造は次の通りであった。

の培養及びモノクローナル抗体の回収は、この分野において周知の方法により行なうことができる。

この発明の方法により作製されたモノクローナル抗体は、対応抗原糖鎖の検出のための診断薬として用いることができる。すなわち、対応抗原糖鎖が癌性変化を受けた糖タンパク質の糖鎖である場合には、その癌の診断薬として用いることができる。

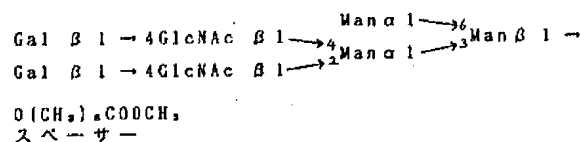
以下、実施例に基づきこの発明をより具体的に説明するが、この発明は下記実施例に限定されるものではない。

[実施例]

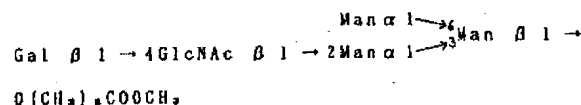
この実施例では、抗原となる糖鎖として、癌性変化を受けたヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の糖鎖を用いた。

(1) 癌性変化糖鎖の構造

妊婦尿から精製したhCGをヒドラジン分解(Takasaki S. ら、"Methods Enzymol.", 83 巻、263 頁、1982)にかけて遊離した少糖をNaB³H₄で



一方、小川らの方法により、正常hCGに見出される、下記の構造を有する5糖を合成した(以下、合成5糖と言う)。



(2) 糖鎖-キャリア結合物の作製

上記合成7糖及び合成5糖をハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体作製の免疫原とするために合成糖鎖のスパーサー部分を介して糖をキャリアタンパク質に結合した。これは、以下のように行なった。

先ず、ガラクトースオキシダーゼとNaB³H₄を用いる合成糖鎖のサイミジン(³H)ラベルを次の手順で行なった。

合成5糖又は合成7糖

↓
ガラクトースオキシダーゼ処理

↓
0.05N NaOH中NaB¹⁸H₄による還元

↓
ペーパークロマトグラフィー
(BuOH:EtOH:H₂O=4:1:1)

↓
紙からの抽出

この方法により、導入された¹⁸Hは、合成7糖について 1.26×10^4 cpmであった。

次に、このようにして標識した合成糖鎖を、キャリアに結合した。用いたキャリアは、BSA、メチル化BSA、KLH、ポリ-L-リジン及びポリ-D-リジンであった。結合はカルボジイミド法により行なった。この方法を具体的にチャートで示すと以下ようになる。

合成5糖又は合成7糖0.1 mg

N-ヒドロキシサクシニイミド 0.15 mg

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・ヒドロクロリド 2 mg

表1

キャリアタンパク質	収率(%)	少糖/キャリアタンパク質モル比
BSA 0.1 mg	7.2	4.3
KLH 0.1 mg	3.1	2.8
ポリ-L-リジン 0.1 mg	48.9	39.6
ポリ-L-リジン 0.2 mg	57.7	23.6
メチル化BSA 0.2 mg	55.0	16.6

キャリアタンパク質 0.1 mg

の混合物(全量100 μl)

↓
一夜インキュベート

↓
セファデックスG50(商品名 (1.6 x 16.5 PBS))

合成5糖についての、タンパク質1モル当りの糖鎖の数及び収率を下記表1に示す。また、図2には生成物のゲルろ過クロマトグラムを示す。

(3) 糖鎖-キャリア結合物による免疫

免疫に用いた抗原はポリ-L-リジン-合成7糖(100 μg/50 μl)とスクシニル化KLH(50 μg/50 μl)との混合物及びメチル化ウシ血清アルブミン-合成7糖(100 μg/100 μl)であった。なお、キャリア分子1個当りに約20個の糖が結合していた。

上記免疫原をフロイドの完全アジュバントとよく混合し、4週齢のBALB/cマウスに、3回免疫を行なった。また、免疫は、イ)尾静脈及び腹腔内接種並びにロ)背の皮下に接種の2経路により行なった。

(4) ハイブリドーマの作製

3回免疫後、各々のマウスの脾細胞を取り出し、ミエローマNS-1細胞(入手先: ATCC TIB18)と常法に従い、ケーラーとミルシュタインのポリエチレングリコール法で細胞融合を行なった。さらに、HAT培地、HT培地選択法により一次スクリーニングを行ないハイブリドーマを得た。この操作は具体的にはポリ-D-リジン-合成7糖を

コートしたマイクロプレートにハイブリドーマクローンの上清を100 μ l 加え、トウイン20PBSで洗浄後、通常のELISA法（酵素免疫測定法）でペルオキシダーゼ染色で陽性のクローンを選択することにより行なった。一次スクリーニングの結果を下記表2に示す。

表2

マウスNo.	免疫原	免疫方法	1次スクリーニングで陽性の出現率
S-1	ポリ-L-リジン 少糖	尾静脈・腹腔	46/211
S-2	+ サクシニルKLH	背の皮下	43/75
C-1	メチル化BSA	尾静脈・腹腔	25/109
C-2	少糖	背の皮下	155/396

(5) 抗合成糖鎖モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

上記一次スクリーニングで陽性が認められたハイブリドーマについて、合成糖鎖-ポリ-D-リジン結合体を用いて、その培養上清との反応性をスクリーニングした。このスクリーニングは、合成糖鎖-ポリ-D-リジン結合体をポリスチレン製マイクロタイタープレートのウェルに結合させ、この中で培養上清をインキュベートし、洗浄後、酵素免疫学的にウェルに結合した抗体を測定することにより、合成糖鎖に対するモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを選択することができる。この操作は具体的には以下のように行なった。

0.05 M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) 中ポリ-D-リジン-合成糖鎖 (10 μ g/ml) 50 μ l/ウェル

↓
4℃にて一夜インキュベート

↓
0.05 M炭酸ナトリウム緩衝液で洗浄

↓
飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中5%無水酢酸
100 μ l 添加

↓
洗浄

↓
0.5%ゼラチン200 μ l (0.01 Mトリス塩酸緩衝液 pH7.4) 添加

↓
室温で3時間インキュベート

↓
洗浄

↓
培養上清50 μ l 添加

↓
洗浄

↓
ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG又はマウスIgM抗体(400-1000倍希釈) 50 μ l 添加

↓
洗浄

↓
A B T S (基質) + H₂O₂ 添加

↓
室温で15分～30分間インキュベート

↓
洗浄

↓
測定 (OD 405nm)

上記方法により、合成糖鎖を抗原とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが4つ得られた。

(6) モノクローナル抗体の回収及び精製

得られたモノクローナル抗体の回収及び精製を以下のように行なった。すなわち、数度のクローニングにより単一の抗体産生細胞株として樹立されたハイブリドーマ4種類はスピナーカルチャーフラスコを用いて1～5日培養上清を採取し、プロテインAセファロースCL-4B(ファルマシア社製)によるアフィニティクロマトグラフィー(富山朔二、安東民衛編、「単クローン抗体実験

マニュアル」講談社サイエンティフィク155～156頁)で精製し、SDS-PAGEで純度検定を行なった。

(7) モノクローナル抗体の特異性と性状

得られた4種類のモノクローナル抗体の特性を表3に示す。

表3
アスパラギン結合型糖鎖特異的モノクローナル抗体
NTOKシリーズ

MoAb	NTOK-1	NTOK-2	NTOK-3	NTOK-4
サブクラス	IgG 2b	IgM	IgG 2a	IgG 2a
純度 ¹⁾	A	C	A	A
抗体濃度	200 μ g/ml	---	200 μ g/ml	200 μ g/ml
力価 ²⁾	1:8	---	1:8	1:8
反応性				
合成7糖	+	++	++	++
合成5糖(非天然型)	++	++	++	++
合成5糖	-	++	-/+	++
合成2糖	-	-	-	-
フェツイン	ND	-	-	-
フェツイン(シアリダーゼ)	ND	++	-	-
HL-60	-	-	+	+
HL-60(シアリダーゼ)	-	++	+	+
形態	0.1% BSA PBS (pH7.2)、NaH ₂ なし			
保存	凍結			

¹⁾純度: A: プロテインAアフィニティにより精製

B: 未精製培養上清

²⁾力価測定法: 合成糖鎖抗原キャリアーをコートしたマイクロプレートでベルオキシダーゼ染色した時の吸光度値

得られた4種類のモノクローナル抗体はいずれも合成2糖と反応しないことからスパーサー及びキャリアタンパク質部分に対する抗体ではないことが明らかである。合成7糖と反応して合成5糖と反応しないモノクローナル抗体はこの場合異常二本鎖構造部分を認識していると考えられる。本実施例の場合の4種類のモノクローナル抗体では合成7糖と反応した抗体は非天然型5糖とも反応した。

本発明の手法を用いて得られたモノクローナル抗体はスパーサーを有さず、またキャリアタンパク質部分を異にするフェツイン細胞株HL-60(ATCC CCL240)及びシアリダーゼ処理したものと特異性に依じて反応することが確認された。このことは本発明のモノクローナル抗体が正しく目的の糖鎖部分と反応していることを示している。

4. 図面の簡単な説明

図1は正常及び癌性変化したヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの糖鎖の構造を示す図。

図2はこの発明の方法において調製された免

疫原のゲルろ過クロマトグラムを示す。

2

特許出願人 株式会社ニチレイ

東和化成工業株式会社

特許出願人代理人 弁理士 谷川 英次郎

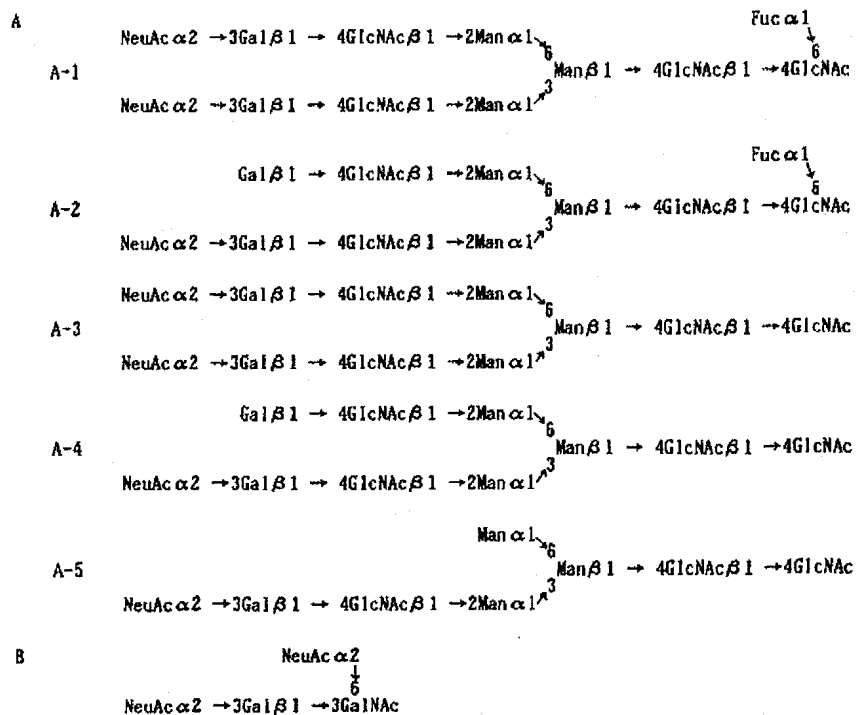
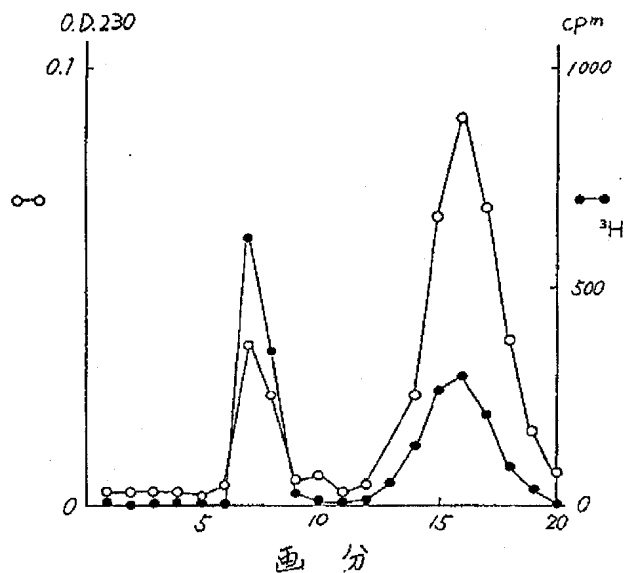
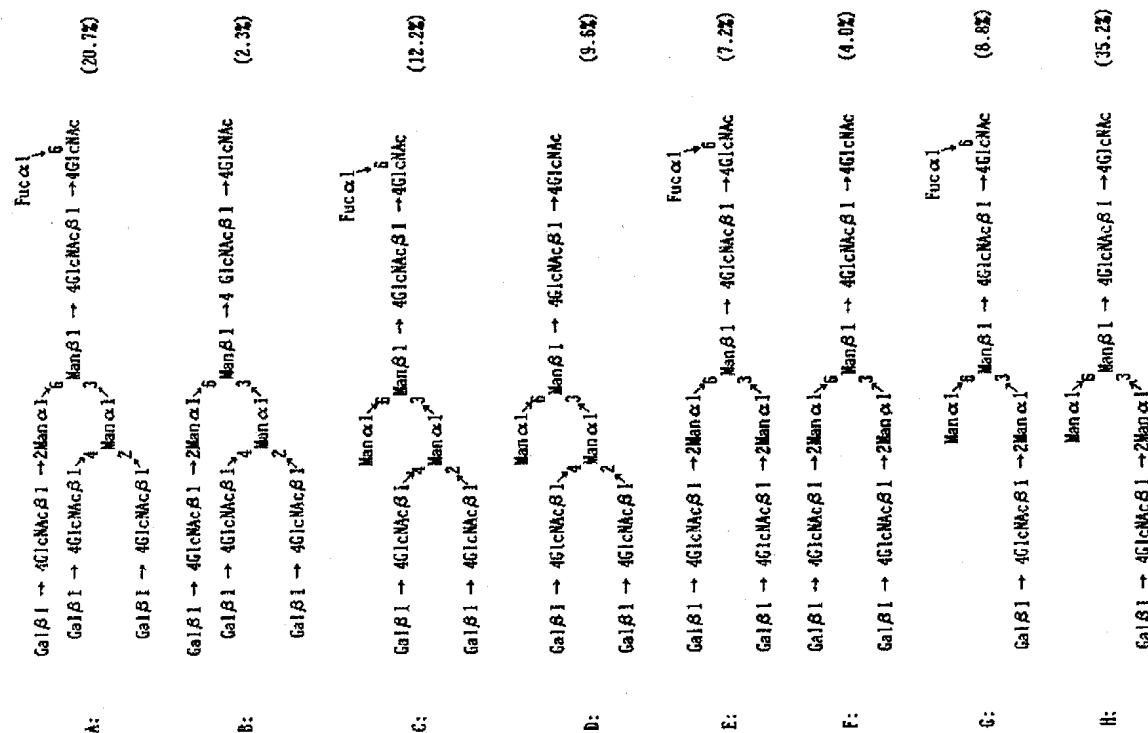


図 1 hCGの全糖鎖構造



手続補正書(方式)

平成1年11月19日

特許庁長官 吉田文敏殿

1 事件の表示 昭和63年特許願第234250号

2 発明の名称

モノクローナル抗体の作製方法

3 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住所 東京都千代田区三崎町三丁目3番23号
名称 株式会社ニチレイ

4 代理人

住所 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号
岩田ビル6階 谷川国際特許事務所
郵便番号102 電話(03)238-9182
氏名 弁理士(8854) 谷川 英次郎

5 補正指令の日付 昭和63年12月20日

6 補正の対象

図面

7 補正の内容

別紙のとおり連続番号を記入した図面(図1)を補充する。

8 上記以外の補正をする者

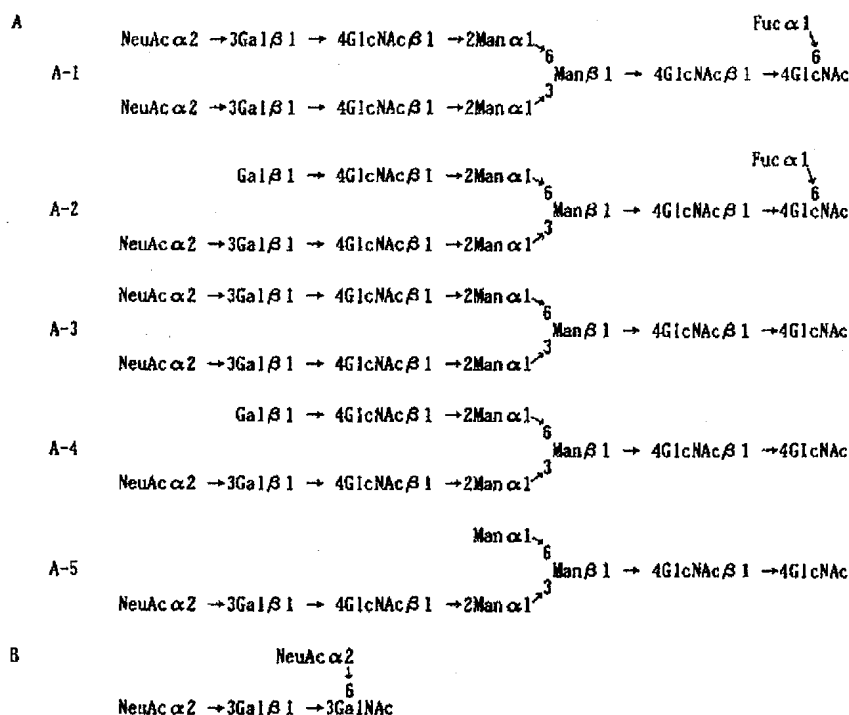
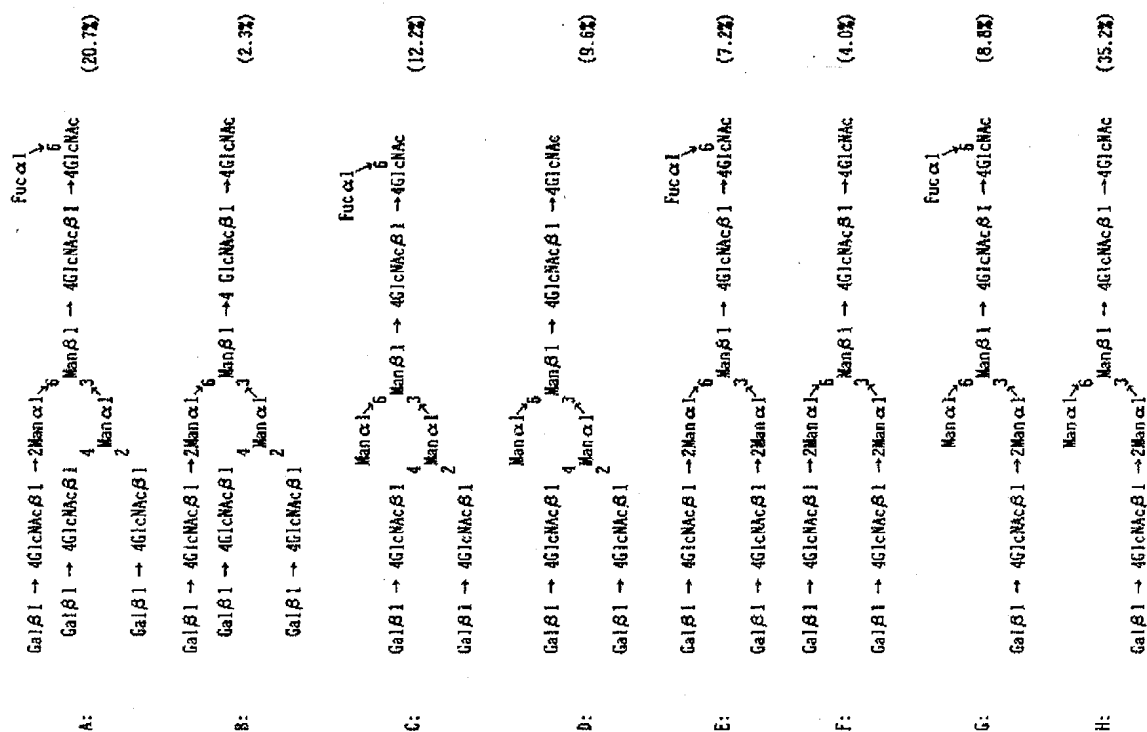
住所 東京都千代田区大手町二丁目1番2号
名称 東和化成工業株式会社

図1 hCGの全糖鎖構造(その1)



() 内は绒毛管1例の全少数に対する個々の少糖のモル分を示す

図1 (その2)